

原 著

共焦点レーザー顕微鏡を用いた組織立体モデルの制作 —3D プリンターの活用を含めた教育用画像の作製法—

黒川 景¹

要旨

組織学は、人体の肉眼レベルの構造と、機能に直結する分子レベルとをつなぐ階層を扱うことから、病態生理の理解の1つの鍵となる学問領域である。しかし、器官・臓器の組織構築は、通常平面による観察手法をとるため、初学者にとって立体構造の把握は容易ではない。共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像から組織の立体像を構築し、教育用の立体視画像の制作や、3D プリンターによる立体モデルの出力法を検討した。臓器ごとにレーザー光の励起および検出波長を調整することにより、蛍光色素による染色を行わない組織の自家蛍光による撮影でも、ある程度良好な画像を得られ、3D プリンターへ出力することが可能であった。新たな研究成果や技術的進歩を駆使した組織の視覚的な教材は、単に医療職やその教育課程を対象とするのみならず、学校の理科教育や、広く一般向けの健康教育活動にも活用できるものと考えられる。

キーワード 共焦点レーザー顕微鏡、3D プリンター、組織学、形態機能学、医学教育

I. はじめに

個体としての人体は、原子・分子レベルから、細胞、組織、器官、器官系といった複数の階層から成り立っている。組織学は、主に細胞、組織といった顕微鏡で観察されるレベルの形態を扱う解剖学の一つの領域であるが、微視的な細胞や組織の構造を理解することは、生理学や生化学といった分子レベルを含めた機能を扱う学問領域の理解と直接的につながる。しかし、器官・臓器の組織像は、教育においても、また病院で行われる日常の病理組織診断においても、光学顕微鏡、電子顕微鏡を含めて微細な構造を透過して観察するという手法上、通常平面による観察が行われ、立体構造の把握は専門家でも必ずしも容易ではない。そのため、顕微鏡レベルの形態は、実際に目にすることのできる肉眼的レベルの形態と比べて、自らの頭の中で平面から空間を構成する、より抽象的な理解力を必要とし、初学者には習得が容易では

ない。

今日の医学、医療は、目覚ましい進歩、高度化が進む一方、これまでにない高齢化社会を背景とした様々な問題を抱えている。このような状況に対応するため、様々な専門領域を含む医学の教育は、医学部のみならず、多岐にわたる医療系職種のエdukashon課程を含む幅広い視野で充実を図っていく必要がある。

医学、医療の進歩は、理工学分野の技術革新に支えられている面が大きい。実際の臨床現場では、CT、MRI等の画像診断装置における撮影法および画像処理技術が進歩し、肉眼レベルの構造については、従来平面で捉えられていた画像から器官・臓器の立体像を容易に構築することができるようになった。さらに3Dプリンターの活用と組み合わせて、骨などの組織を補てんする材料の作製や(Saijo, Kanno, Mori et al., 2011)、肺移植などの手術法のシミュレーションにも用いられている(京都大学, 2014)。

組織像の解析に関しても著しい研究手法の進歩がみられ、共焦点レーザー顕微鏡や、最近では二光子励起顕微

¹ 日本赤十字豊田看護大学 専門基礎

鏡といった最先端技術の導入によって、空間、時間経過を含めた細胞学的、組織学的構築に関する研究が進められつつある。このような研究の進歩、情報・画像処理技術の高度化の成果を、医学教育の中にも積極的に取り入れ、楽しく学び理解の助けとなる教材を作成する努力と工夫が、次世代を担う医療従事者の育成に大きな意味を持つものと考えられる。

既に生きた細胞から 3D プリンターで組織を再構築する試みがなされているが (Arai, Iwanaga, Toda et al., 2011)、まだ複雑な組織構築の再現までには程遠いのが現状である。実質的に、組織学及び組織病理学やその教育における 3D プリンターの活用は、未開拓の分野である。本研究は、その第一歩としてマウスを使用し、共焦点レーザー顕微鏡を用いた器官組織の立体画像の構築から、視覚的な教材を作製する方法の検討を目的に実施した。特に、組織学教育における 3D プリンターの活用に向けて、複雑な形状を示す組織構造を出力する手法の検討も行った。この研究で得られた方法をさらに発展させ、視覚教材の充実を図ることにより、構造と機能の結び付いた病態生理のより一層深い理解につながるものと考えられる。イメージの湧きにくい器官の組織構築の学習を、初学者が興味を持って取り組むきっかけとなるだけでなく、看護をはじめとする医療系職種の大学院教育や生涯教育といった、さらに高度な内容が求められる教育においても活用できるものとする。

II. 研究方法

1. マウス臓器の摘出

動物実験にあたっては、「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、「愛知医科大学動物実験規定」に基づいて必要な教育訓練を受け、手続きを行った上で実施した。C57BL/6 マウスに、塩酸メデトミジン (0.3mg/kg)、ミダゾラム (4.0mg/kg)、酒石酸ブトルファノール (5.0mg/kg) の 3 種混合麻酔薬を腹腔内投与し、十分な麻酔深度を得て苦痛がないことを確認した後、開胸、開腹し、臓器を摘出した。

2. 組織材料の処理法

1) 自家蛍光法を用いた観察材料の処理

4 か月齢のマウスより、十分な深度の麻酔下に臓器を摘出し、20% 緩衝ホルマリン固定の後、サリチル酸メ

チル溶液による組織の透明化処理を行った。組織標本作成で広く用いられるホルマリン固定材料による透明化法で、形態の保持がよく、病理検査で汎用されているホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin embedded: FFPE) 材料にも応用可能である (Faverly, Holland, Burgers, 1992)。

肺の場合は、摘出後ただちに気管より注入固定を行った。2 日間、室温で振盪固定を行った後、約 2mm 厚に切片を切り出した。実体顕微鏡での組織の観察、確認用にヘマトキシリンで核の染色 (Gill のヘマトキシリン液 30 分、流水洗浄 1 時間、1% 塩酸アルコール 8 時間) を行った。95% エタノールで 8 時間脱水、99.5% エタノールで 48 時間脱水の後、アセトン中で 30 分振盪、サリチル酸メチル溶液に 2 時間浸漬した。アセチル酸メチル溶液を入れた真空パック用フィルムに入れ、真空包装装置で脱気密封し保存した。観察時に組織をパックより出し、キシレンに浸漬の後、実体顕微鏡観察下に 0.7 ~ 0.8mm 厚に薄く切り出した。組織をホールスライドグラスへ移し、DPX (Merck Millipore 社) で封入し、観察した。

2) 蛍光抗体法を用いた観察材料の処理

組織の抗原性保持がホルマリン固定より良好とされる 4% パラホルムアルデヒドで固定の後、蛍光抗体法を実施し、蛍光強度の保持のため benzyl alcohol/benzyl benzoate (BABB) 溶液による透明化処理を行った (Dodt, Leischner, Schierloh et al., 2007; Yokomizo, Yamada-Inagawa, Yzaguirre et al., 2012)。

蛍光ラベルした抗体の浸透には限度があるため、本研究では、臓器のサイズが小さいマウスの副腎を材料とし、血管内皮マーカーである CD31 の抗体を用いて血管の立体構築を検討することとした。若年齢よりも高齢のマウスの方が、副腎髄質の血管がより拡張し、抗体が血管腔に沿ってよく浸透することから、8 か月齢のマウスを使用した。

十分な深度の麻酔下に臓器を摘出し、4% パラホルムアルデヒドで 4℃、一晚振盪固定の後、0.1M リン酸緩衝液で 10 分ずつ 3 回洗浄、15% スクロース含有 0.1M リン酸緩衝液中に 1 晩振盪した。7.5% ゼラチン、15% スクロース含有 0.1M リン酸緩衝液に移し、37℃ 1 時間静置の後、アルミ箔で作製した小容器の中に先ほどのゼラチン含有リン酸緩衝液を入れ、組織を移して包埋

し、ドライアイスで冷却したアセトン中に容器を入れて凍結の後、 -85°C で保存した。凍結組織はクライオスタット (Leica 社 CM3050S) で厚さ 250 マイクロメートルの切片に切り出し、スライドガラスに貼り付けた。PBS で 3 回洗浄の後、非特異的抗原抗体反応をブロックするため、組織を 0.4% Triton X-100、4% ヤギ血清を含有する PBS (以下ブロッキング溶液) に室温 1 時間浸漬した。その後、ブロッキング溶液に Hoechst 33342 ($20\text{ }\mu\text{g/ml}$) と Alexa 647 でラベルした CD31 抗体 ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$) (BioLegend 社) を溶解し、1 晩反応させた。リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS) で 10 分ずつ 3 回洗浄し、メタノール置換 (50% メタノール 10 分 1 回、100% メタノール 10 分 2 回) を行った後、benzyl alcohol と benzyl benzoate を 1:2 に混合した溶液 (BABB 溶液) に一晩浸漬し、組織を透明化した。余分な BABB 溶液をふき取り、カバーガラスをかけて封入、観察した。

3. 画像処理法

共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss 社) を用い、スキャン面を移動させて連続する組織平面像を撮影した。レーザー照射が組織の深部に至るにつれ、撮影される像の輝度、コントラストが低下するため、共焦点レーザー顕微鏡画像用のソフト ZEN2012 (Carl Zeiss 社) で、輝度、コントラストの平均化を行った後、一連の平面像を Tag Image File Format (TIFF) 形式で出力した。Volume Extractor Ver. 3.0 (i-plants systems 社) を用いて、出力した一連の平面像より立体像を構築した。両眼視用のステレオ画像は、Volume Extractor の「カメラ」機能により、立体像を左右に 10° 回転させた画像を作成の後、StereoPhoto Maker Ver.5.05 (須藤, 2014) で右側回転した画像を左に、左側回転した画像を右に配置し、交差法による立体視画像を合成した (図 1~9)。

4. 3D プリンターへの出力

3D プリンターは、今日、各社から様々な出力方式のものが出ているが、事実上 3D System 社が開発した STL (Stereolithography) ファイル形式が標準フォーマットとなっている。前項 3 で構築した立体画像を 3D プリンター出力用に変換するために、Volume Extractor Ver. 3.0 を用いて次の 1) から 4) の作業を実施し、

STL ファイルに出力した。

1) 構造物の等値化

共焦点レーザー顕微鏡撮影画像には輝度のグラデーションがあるが、この作業により出力部分と非出力部分を明確化する。

2) ポリゴン形式への変換

構造物を三角形のパッチの集合体 (ポリゴン) で表現する。

3) ノイズの除去、構造物表面の平滑化 (必要に応じて実施)

4) 画像の抽出 (必要に応じて実施)

プレゼンテーションに必要な構造物を領域拡張法により抽出、あるいは不要な構造物を除去する。

以上の作業の後、作成された STL ファイルを実際に 3D プリンターで出力するが、ポリゴンのパッチの欠損や表裏の異常といった出力用構造体としての欠陥があるとエラーとなるため、出力前に nettfabb Basic Ver. 5.2 (nettfabb 社) を用いて構造体の修復を行った。

一般的な積層法の 3D プリンターでは、構造物に不連続の部分があると出力が不可能となるため、支持構造の付加が必要となる。今回は、精細な造形が可能なインクジェット方式の 3D プリンターで、水溶性のサポート材により、構造上不連続な部分があっても出力可能である特長を有することから、Keyence 社の 3D プリンター Agilista を用いて出力を行った。

Ⅲ. 結果

1. 自家蛍光撮影におけるレーザー光の励起波長および検出波長の最適化

一般に蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡は、ある特定の励起、検出波長を持つ蛍光でラベルした物質を検出するために用いられるため、細胞、組織の自家蛍光は非特異的シグナルとして、その除去法が問題となる (Baschong, Suetterlin, Laeng, 2001)。そこで透明化処理を行った標本の自家蛍光を検討したところ、レーザー光の出力、励起および検出波長を調整することにより、組織の構造や、条件がよければ細胞のある程度の形態を観察することが可能であることがわかった。検討の結果、腎臓の組織は helium neon (HeNe) laser 543nm 励起で 560nm の filter で検出するのが、輝度とコントラストにおいて最適と判断した。肺は腎臓と同条件でも撮影が可能であったが、blue diode laser 405nm で励起し

広範囲の波長で検出する方が、より鮮明な画像を得られた。肝臓は argon (Ar) laser 488nm で励起し、550 ～ 625nm の filter で検出するのが最適と判断した。

2. 自家蛍光撮影による肺の立体画像

1) 肺胞 (図1)

対物レンズ 20 倍、1 画素の 1 辺 $0.311 \mu\text{m}$ で xy 方向 2048×2048 画素の平面像を、z 軸方向に $1 \mu\text{m}$ 間隔 41 面で立体像を構築した (像の各辺は $636.09 \mu\text{m} \times 636.09 \mu\text{m} \times 40.0 \mu\text{m}$)。ガス交換の場としてのスポンジ状構造の肺胞が観察される。

2) 細気管支 (図2)

油浸対物レンズ 63 倍、1 画素の 1 辺 $0.14 \mu\text{m}$ で xy 方向 1024×1024 画素の平面像を、z 軸方向に $0.14 \mu\text{m}$ 間隔 151 面で立体像を構築した (像の各辺は $142.72 \mu\text{m} \times 142.72 \mu\text{m} \times 21.0 \mu\text{m}$)。細気管支内腔面を覆う腺上皮が、内腔に向かって突出している。レーザー光の励起によって、腺上皮の細胞質は明るく発光し、核が暗く抜けて見える。気管支の近傍に、肺動脈の分枝が並走する。肺動

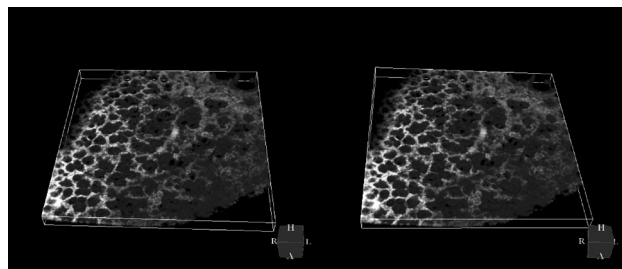


図1 肺胞

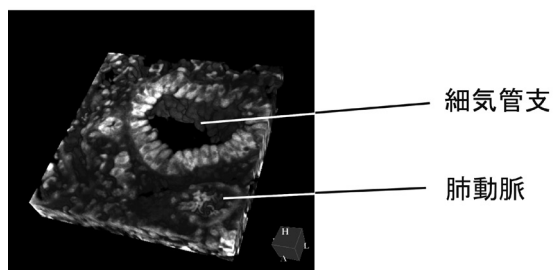
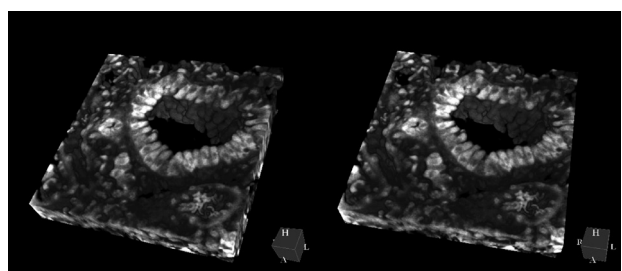


図2 細気管支

脈の内腔に、中央が陥凹した円盤状の赤血球が観察される。赤血球は、励起により明るく発光する。

3. 自家蛍光撮影による腎皮質の立体画像 (図3、4)

油浸対物レンズ 63 倍、1 画素の 1 辺 $0.28 \mu\text{m}$ で xy 方向 512×512 画素の平面像を、z 軸方向に $0.28 \mu\text{m}$ 間隔 250 面で立体像を構築した (像の各辺は $142.58 \mu\text{m} \times 142.58 \mu\text{m} \times 70.0 \mu\text{m}$) (図3)。腎小体と周囲の近位尿細管が観察される。近位尿細管の細胞質には発光がみられ、核が暗く抜けて見える。尿細管間の毛細血管内の赤血球が、励起により明るく発光する。この立体像からはあまり目立たないが、平面像では糸球体の毛細血管も明るく発光している。糸球体血管をドレナージする輸出入動

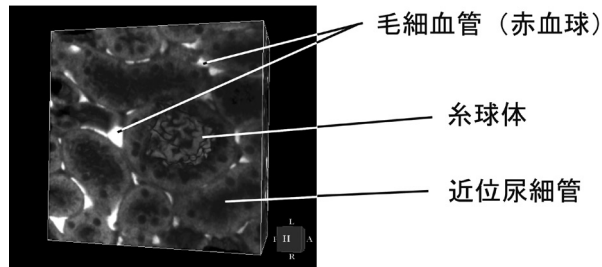
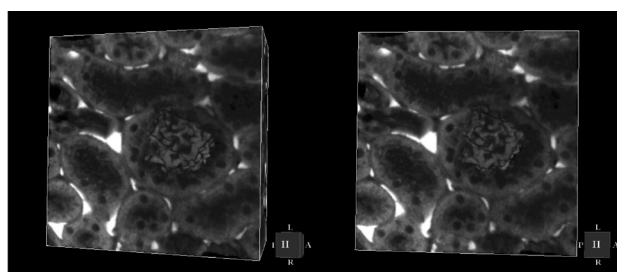


図3 腎皮質

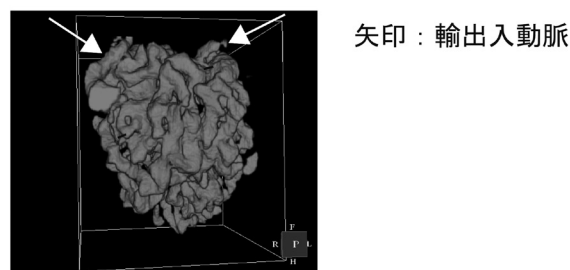
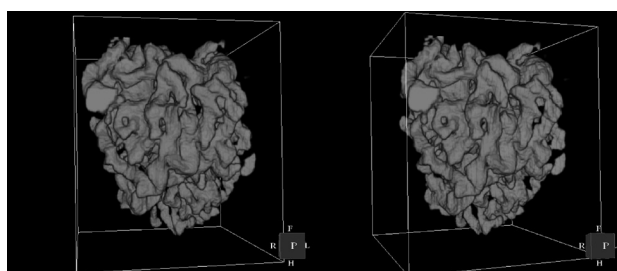


図4 糸球体毛細血管

脈および尿管周囲毛細血管は細く、得られた画像からは、臓器摘出時に糸球体および尿管周囲間質はうっ血状態であると考えられる。

撮影した画像から、輝度の高い糸球体血管を領域拡張法により抽出した（立方体の各辺は $59.15\ \mu\text{m} \times 63.89\ \mu\text{m} \times 70.0\ \mu\text{m}$ ）（図4）。一連の平面像と対比させた検討から、糸球体周囲の血管との連続性を示す部分が2か所認められ（矢印）、この部分が輸出動脈および輸入動脈に相当する。両者の同定は、撮影範囲外にある糸球体の上流にある動脈との連続性を検討する必要があるが、教科書的に輸入動脈の方が輸出動脈より太いとされていることから、左側の矢印の血管が輸入動脈と考えられる。

4. 自家蛍光撮影による肝臓の立体画像

1) グリソン鞘周囲（図5）

油浸対物レンズ63倍、1画素の1辺 $0.28\ \mu\text{m}$ で xy 方向 512×512 画素の平面像を、z 軸方向に $0.28\ \mu\text{m}$ 間隔140面で立体像を構築した（像の各辺は $142.58\ \mu\text{m} \times 142.58\ \mu\text{m} \times 38.92\ \mu\text{m}$ ）。グリソン鞘にみられる門脈、胆管、肝動脈の分枝が並走しているのが観察できる。3者のうち最も径が太いのが門脈で、肝動脈は門脈に比べて極めて細い。胆管には核が暗く抜けた立方状の腺上皮が観察される。門脈や肝動脈内の赤血球は明るく発光し、門脈内に中央が陥凹した円盤状の赤血球が観察される。

2) 中心静脈周囲（図6、7）

①と同条件で撮影し、z 軸方向69面で立体像を構築した（立体像の各辺は $142.58\ \mu\text{m} \times 142.58\ \mu\text{m} \times 19.04\ \mu\text{m}$ ）

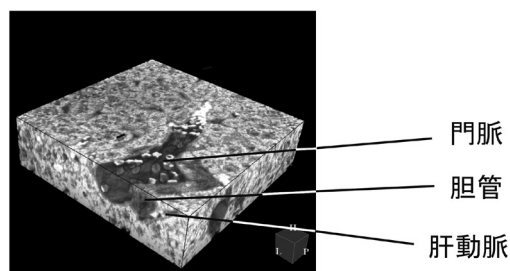
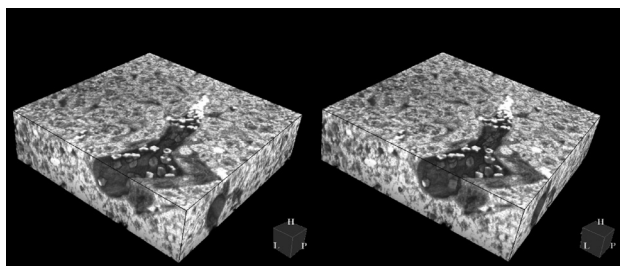


図5 肝グリソン鞘周囲

（図6）。中心静脈の周囲に、索状に並ぶ肝細胞が観察される。肝細胞索間には類洞（洞様毛細血管）が認められ、中心静脈に注ぐ。類洞のドレナージ血管である中心静脈は、赤血球に対して十分な太さがあることから、得られた画像からは、臓器摘出時にはほぼ脱血状態と考えられ、類洞にも残存している赤血球は比較的少ない。

撮影した画像を白黒反転し血管腔の領域を白に変換した後、領域拡張法により中心静脈およびの周囲の類洞のみを抽出した（図7）。図では、画像処理により抽出した血管を赤く表示してある。肝細胞索間の類洞が、中心静脈へ合流する様子が観察される。

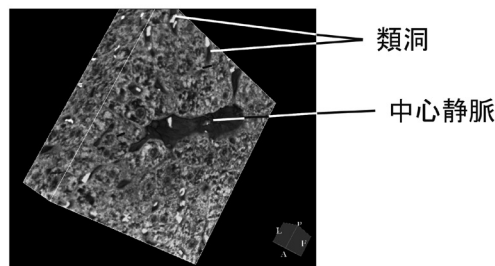
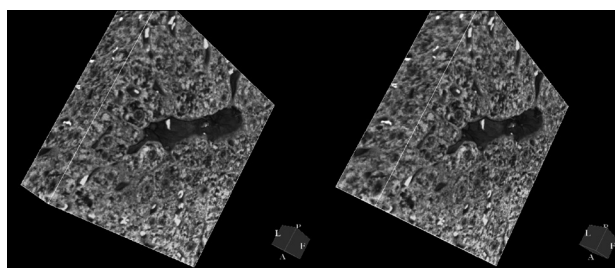


図6 肝中心静脈周囲

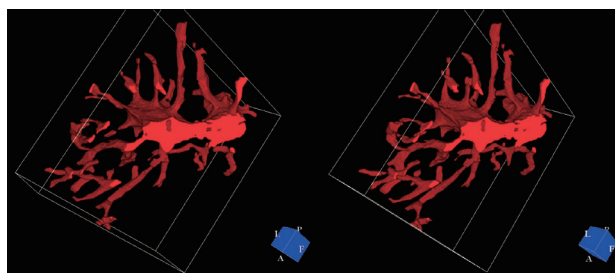
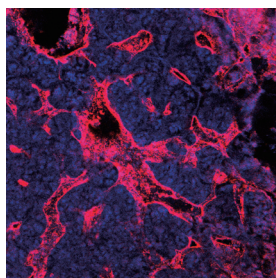


図7 中心静脈と類洞

5. 蛍光抗体法による副腎髄質の血管構築（図8、9）

核を染色する Hoechst 33342 を blue diode laser 405nm で励起し 420 ~ 480nm の filter で検出、Alexa 647 ラベル抗 CD31 抗体で染色された血管内皮を HeNe laser 633nm で励起し 650nm の filter で検出した。対物レンズ20倍、1画素の1辺 $0.44\ \mu\text{m}$ で xy 方向 1024×1024 画素で撮影した平面像のうちの1面を示す（図8）。核が青、毛細血管の内皮が赤で示されている。副腎皮質の

組織が HeNe laser 633nm の励起で非特異的な発光を示したため、その部分を除去して xy 方向 549×772 画素平面画像とし、z 軸方向に $1.2 \mu\text{m}$ 間隔 62 面で立体像を構築した（立体像の各辺は $241.01 \mu\text{m} \times 338.91 \mu\text{m} \times 74.4 \mu\text{m}$ に相当）。赤で染色された血管の立体像を構築した（図 9）。網目状に走行する毛細血管が観察される。



青：核 (Hoechst 33342)
赤：毛細血管 (CD31)

図 8 副腎髄質毛細血管（平面像）

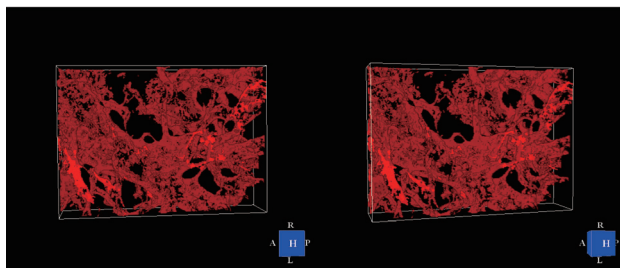


図 9 副腎髄質毛細血管（立体像）

6. 3D プリンターへの出力（図 10）

図 4 の腎糸球体血管の立体像を 3D プリンターに出力した。研究方法に記載した画像ファイル処理により、出

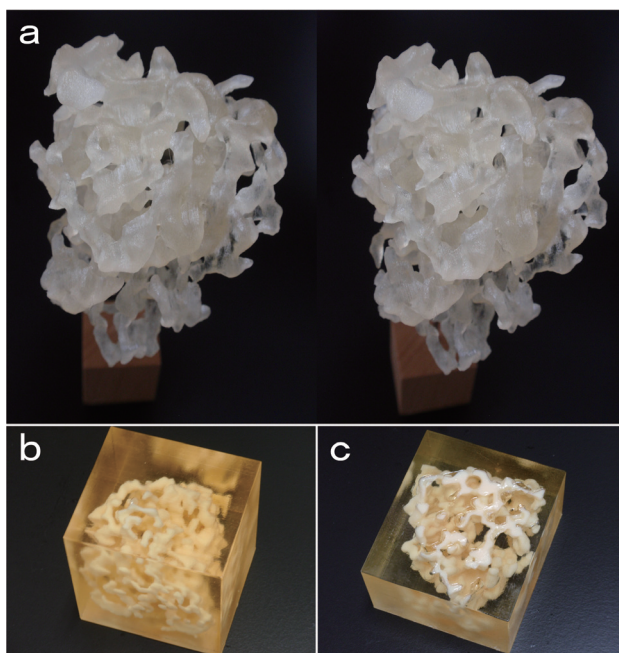


図 10 3D プリンターで出力した糸球体毛細血管

力エラーなく造形に成功した。造形物の支持台を左右に 10° ほど回転させて撮影した 2 枚の写真による、交差法の立体視像を提示する（図 10 a）。この模型の場合、展示のために支持物を工夫する必要がある。そこで、構造物樹脂に透明性があり水溶性サポート材が白色不透明であることを利用し、画像の白黒反転処理によって構造物樹脂とサポート材を入れ替えた模型も作製した（図 10 b）。立方体形状の模型で、安定した展示が可能となる。また、この立方体を任意の断面で切断した模型も作製可能である（図 10 c）。

IV. 考察

1. 技術的課題

1) 標本作製および撮影法の課題

もともとの細胞、組織が持つ自家蛍光は、特に固定後の標本で増強することが知られているが、蛍光ラベルによる細胞、組織の構成物質の検出においては非特異的シグナルとなるため、文献的にもそれを除去する方法が検討の対象となっている（Baschong, Suetterlin, Laeng, 2001）。今回、レーザー光の強度や励起、検出波長を調整することによって、自家蛍光による組織構造を捉えることができることを示した。自家蛍光による励起、検出の条件は臓器ごとに異なっていたが、自家蛍光を除去する最適な方法が臓器ごとに異なるとの文献的記載に対応するものと考えられた。

赤血球は自家蛍光を発することから、文献的にもマウス胎仔の血管のイメージングに用いられた報告があるが（Dodt, Leischner, Schierloh et al., 2007）、今回腎臓の糸球体毛細血管の立体像を自家蛍光によって構築することができた。一方、肝臓の中心静脈、類洞は、作製した試料ではほぼ脱血状態であり、血管腔として立体像を構築した。このように、腎臓と肝臓で原理に違いがあるものの、自家蛍光による撮影法は血管の立体像構築に有用であった。

今回の自家蛍光による撮影法で、例えば透明化処理をした肺であれば、対物レンズ 10 倍の弱拡大像で最大 $400 \mu\text{m}$ ほどの深度の画像を得ることが可能であった。ただし、弱拡大像で鮮明な画像を得るためには、画素数を上げた精細条件での撮影が必要であり（図 1）、数百枚に及ぶ多数の精細平面画像から立体像を構築するためには、十分な画像処理能力を有するグラフィック対応の

高性能なコンピュータないしワークステーションが必要であることがわかった。これに対し、対物レンズの倍率の高い油浸光学系では、画素数を下げても解像度の良い画像が得られ（図2～図8）、今日一般に市販されているコンピュータのスペックで十分実用的な画像処理が可能であった。例えば、腎臓であれば、糸球体の立体画像よりも、ネフロン全体の精細な立体画像を得るための方が高い画像処理能力を必要とする。弱拡大で広い範囲の像を把握し、強拡大で微細な構造を観察することにより、立体像の理解が深まるため、教育用画像としては両者を用意するのが理想であるが、そのためには、画像処理のための十分な環境整備が必要である。

共焦点レーザー顕微鏡は、本来、蛍光ラベルされた物質を観察対象とするが、特に蛍光ラベルに蛍光抗体を用いる場合には、抗体が大きな分子であるため組織内への浸透に限界がある。今回は、通常の薄切切片における方法と同様、試料をスライドガラスに貼り付けたため、貼り付けた面から蛍光抗体が浸透せず、100 μm 程度が限界であった（図8、9）。文献的にも150 μm あたりが浸透の限界で、切片厚として300 μm 以下にする必要があるとの記載がある（Yokomizo, Yamada-Inagawa, Yzaguirre et al., 2012）。研究レベルでは、神経細胞など特定の細胞に green fluorescent protein (GFP) などの蛍光を発する遺伝子組み換えマウスを用い、その蛍光を立体的に解析することが行われるが（Dodt, Leischner, Schierloh et al., 2007）、教育用の画像を得る方法として検出する細胞や組織ごとに遺伝子組み換えマウスを用意することは、あまり現実的ではない。蛍光ラベル物質の組織浸透性を高めるために、組織材料の固定、反応液の界面活性剤の濃度や反応時間の長さ、攪拌方法等の検討が必要である。反応液の攪拌については、近年新たな技術として、術中迅速病理診断用の免疫染色標本作製のため抗原抗体反応を促進することを目的に開発された電界攪拌染色装置がある（サクラファインテック, 2014）。抗原抗体反応時間の短縮を目的とするが、抗体の組織浸透性の改善に利用できないか検討する価値があるものと考ええる。

なお、実験動物においては、血管を蛍光ラベルする方法として、生きている状態で蛍光ラベルしたトマトレクチンを静注する方法がある（Debbage, Griebel, Ried et al., 1998）。この方法を用いると、切片厚に関わらず血管像を撮影し構築できる。

2) 3D プリンター出力の課題

3D プリンターには、光造形、粉末焼結、熱溶解樹脂積層法、インクジェット方式、石膏粉末を樹脂で固め積層する方式といったさまざまな造形方式がある。用いられる材料も、樹脂系の素材をはじめとして、石膏、金属を含め多様である（水野, 2013）。今回用いた3D プリンターは、光硬化性のアクリル系樹脂を材料とするインクジェット方式である。複雑な組織構築を出力するためには、精細な出力性能が必要であるが、インクジェット方式は細かな造形に向いているとされている。また、水溶性のサポート材に特徴があり、出力構造体としてのポリゴンに欠陥がなければ、構造体に不連続部分があっても出力可能であることが利点と考えられた。

立体模型を作製する場合、構造体としての強度、色、硬さや柔軟性といった観点を含めて、造形方式やそれに依存する材料を選択する必要がある。今回の研究では、単色のみの出力であったが、蛍光抗体法で複数の蛍光物質を用いて同時にいくつかのタンパク質をラベルし、色分けされた組織構築を3D プリンターで出力する場合は、カラー対応の3D プリンターを使用することが必要となる。従来フルカラー出力が可能なのは石膏粉末を用いた方式のみであったが（水野, 2013）、最近では、多様な樹脂素材に対応したカラー3D プリンターも市販されている。通常のSTL ファイルには含まれていない色の定義を含めた画像処理が必要である。

2. 作製した視覚教材に関連する組織形態と生理学的機能の解説

器官の組織構造と機能とは密接な関連があることから、視覚教材で示される形態を手掛かりに関連する機能を解説することによって、理解の助けになるものと考えられる。時間に余裕があれば、画像の説明に自ら取り組み学習法も教育効果が上がるものと考えられる。

図1では、肺胞が細かいスポンジ状の構造を示す肺胞の立体構築が示されている。薄い壁がガス交換の場となっており、酸素の体内への取り込みと二酸化炭素の放出、ガス分圧、体内での酸素や二酸化炭素の運搬、呼吸と体内のpH調整といった項目とつながる。間質性肺炎といった病名に用いられる肺の実質と間質の関係についても、説明の助けとなる。

図2では、気管支の分枝が末梢レベルまで肺動脈の分枝と並走していることが示されている。気管支腺上皮表

面の線毛は描出されていないが、腺上皮の形態は明瞭に描出されている。ガス交換にかかわる肺胞の構造とは異なり、気管支を被覆する腺上皮は、外からの異物や刺激からの防御のため密に配列し、粘液の分泌、線毛運動によって異物を痰として排出する。

図3では、糸球体と尿細管が描出されている。近位尿細管は、ナトリウムやカリウム、水素等のイオン交換を行っており、そのエネルギー産生を担う豊富なミトコンドリアを含む。通常のH-E所見で、近位尿細管上皮のミトコンドリアはエオシン好性の糸状ないし粒状物として認識されるが、共焦点レーザー顕微鏡の平面像でも、よく見ると尿細管上皮の細胞質は均一ではなく粒状に高輝度であり、ミトコンドリアに由来する自家蛍光を拾っている可能性が考えられる。図4では、糸球体の毛細血管のみの画像であるが、血液から原尿を濾し出す濾過装置としての形態が観察できる。ネフロンとその機能の理解の一助になると考えられる。

図5では、肝臓の門脈、胆管、動脈は末梢に至るまで並走することが示されている。図6、7では、肝細胞の代謝にかかわる物質の取り込み、産生した物質の血中への放出の場である類洞が、肝細胞索間に走行し、中心静脈へ合流する様子が観察される。

図8、9で示される副腎髓質毛細血管網は、交感神経緊張状態の際に副腎髓質細胞の産生するアドレナリンが放出される場であり、自律神経系の機能と関連がある。

3. 組織立体像の医学教育における活用について

解剖学は、医学部のみならず、看護をはじめとするさまざまな医療系職種のエdukation課程で、その初期段階に修得が求められる重要な基幹科目である。しかし、医学部ほど解剖学をはじめとする基礎医学の学習に時間をかけることができず、また、一部の恵まれた状況を除いては、医学部で実施されているような解剖学実習や組織学実習のような、実際の体のしくみに直接触れる機会に乏しい。このような限られた条件の中であるが、医療の高度化に伴い、医療系の教育課程において、解剖学をはじめとする医学や生命科学の基礎を効率よく修得する必要があるものと考えられる。

看護の教育課程における医学教育は、1980年代末からの指定規則の改正により、まず解剖学、生理学を解剖生理学に統合し、さらに生化学、栄養学、薬理学、病理学、微生物の内容を含めて、今日「人体の構造と機能」

および「疾病の成り立ちと回復の促進」という形に統合されている（梶原，清村，鹿嶋，2008）。従来からある学問領域の枠組みに捉われず、人間を部分や単なるメカニズムでなく総合的な視点からとらえようとする看護の専門課程の学習につながるよう工夫された改正と捉えることができる。このような中で、看護の視点から形態機能学の教育方法を工夫する試みがなされている。しかし、年々学ぶ内容の増える過密な教育課程の中であって、人体の構造と機能を扱う形態機能学は情報量が多く難解な内容を含むこと、その後の看護の学習内容との接点を学生自身から見出すことが必ずしも容易でないことから、授業方法に関わらず、内容の理解に関する評価が低いことが問題点として指摘されている（菱沼，齋木，大久保，2002）。

肉眼的レベルから細胞・組織レベル、分子・原子レベルに至る人体の各階層を関連付け、形態と機能の面から有機的に理解することが、生理的な仕組みや病態の理解の上で重要であり、そのことが看護をはじめとする医療職に求められる人間の総合理解につながる。組織学は、人体の肉眼レベルの構造と、機能に直結する分子レベルとをつなぐ階層を扱うことから、病態生理の理解の1つの鍵となる領域であるが、肉眼的解剖と比べさらに抽象的な内容で、看護においてはその後の専門的な学習との接点が見出しにくいものと考えられる。このような状況に対し、組織の立体視画像や、実際に手に取って様々な角度から観察できる立体模型によって組織の立体的構造を体感することができれば、学習のモチベーションを高めることにつながるものと期待される。今回作製した糸球体の立体モデルの例では、血液から原尿を濾し出すフィルターとしての毛細血管の屈曲構造を視覚的に実感することができる。

教育には多角的アプローチが必要であり、看護の視点からのアプローチや工夫が重要なのはもちろんであるが、看護との関わりといった視点にとどまらない学問としての体系や、その魅力を伝えることも、すぐに目に見える形での効果は期待しにくいものの、より深い学習を促す上で意味があるものと考えられる。このような視点は、さらに先の教育課程、すなわち、医療、医学の進歩や変化を背景とした医療職としての生涯教育や、大学院教育の重要性ともつながる。たとえ入学後すぐの段階で学んだ解剖学、組織学、生理学等の内容に興味を持てず、十分に習得できなかったとしても、一通り専門的な

内容を学んだ後にもう一度見直すことによって、看護の視点を含めた新しい視野が得られるであろう。さらに、医療現場に出てからの1つ1つの経験から、高度な専門的内容の学習や研究への意欲が生まれる。教育および学習には、様々な過程や段階をいわば行きつ戻りつするような性質があり、医学教育を職業人としての生涯を含めた長い時間経過で、幅広く捉えていく必要があるものと考えている。

イメージが湧きやすく、興味が深まるよう、新しい技術や研究成果を有効に生かした良質な視覚的教材を工夫し、必要な時に活用できるよう提供することは、組織学領域の教育において、初学から高度な専門教育にも資する効果的なアプローチの一つと考えられる。

V. まとめと今後の展望

初学者から大学院レベル、生涯教育に至るまで、看護をはじめとする医療従事者を含めた幅の広い対象をもつ医学教育に、新たな研究成果や技術的進歩を還元していく努力や工夫が今後とも求められる。医学教育は、様々な領域からの多面的なアプローチが必要であることは言うまでもないが、その中の1つとして、本研究では組織立体モデル作成の試みとその教育への活用法を提示した。

組織の教育用立体画像の構築には、標本作製、撮影、画像処理、出力といった各プロセスの設備や環境を整える必要がある。近年3Dプリンターは、数万円で購入可能なものも販売されるようになってきているが、精細な出力性能を持つものや、カラー対応機種は極めて高価である。多様な出力方式、造形物の材料を検討するために、現時点では出力サービスを利用するのが現実的と考えられるが、まだ高価である。しかし、将来的には技術革新や普及によって3Dプリンターの値段が下がり、活用の幅が広がっていくことは間違いないであろう。

今回は、先行的研究の意味で、マウスの臓器を用い、基本的な方法論や手技の検討を行った。今後の展望としては、立体画像構築上の技術的改良を進めつつ、教育・研究のための使用に同意を得られた献体や剖検由来の人体組織を含めて様々な器官組織の立体画像を蓄積し、アーカイブ化することが考えられる。貴重な試料に由来する視覚的な教材をweb上で共有することにより、単に医療職やその教育課程を対象とするのみならず、学校の

理科教育や、広く一般向けの健康教育活動にも活用できるものと考えられる。標本作製や教育用に適した画像の制作は、手間と時間のかかる作業であるが、誰もが必要に応じてファイルをダウンロードしたり、3Dプリンターに組織の模型を出力できるよう、アーカイブの構築を目指していきたい。

謝辞

本研究の実施に当たっては、学校法人日本赤十字学園教育・研究及び奨学金基金の支援をいただいた。ホルマリン固定材料の透明化に関する基本的な方法については、名古屋医療センター臨床検査科市原周医師のご指導をいただいた。研究に必要な機器、施設の利用、標本作成に関しては、愛知医科大学医学部病理学講座（佐賀信介教授、村上秀樹准教授、金子吉文助手、小島誌野助手、山田徳香助手）、大垣市民病院病理診断科（岩田洋介医師、奥田清司室長）のご協力をいただいた。特に共焦点レーザー顕微鏡の使用にあたっては愛知医科大学先端医学研究センター（吉川和宏教授）に便宜を図っていただいた。実験動物については、愛知医科大学総合医学研究機構動物実験部門（奥村正直准教授）のご協力をいただいた。3Dプリンター出力については、株式会社キーエンス岡田裕一様のご支援をいただいた。教育に関する考察は、日頃の講義等での経験を背景とするもので、特に担当する大学院病態生理学を受講した院生との対話によるところが大きい。多くの方々に研究のご支援、ご協力をいただいたことを、ここに深謝する。

利益相反（conflict of interest: COI）について

本研究に関連し、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

文献

- Arai K., Iwanaga S., Toda H. et al. (2011). Three-dimensional inkjet biofabrication based on designed images. *Biofabrication*, 3(3), 034113.
- Baschong W., Suetterlin R., Laeng R.H. (2001). Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM). *J Histochem Cytochem*, 49(12), 1565-1572.
- Debbage P.L., Griebel J., Ried M., Gneiting T. et al.

- (1998). Lectin intravital perfusion studies in tumor-bearing mice: micrometer-resolution, wide-area mapping of microvascular labeling, distinguishing efficiently and inefficiently perfused microregions in the tumor. *J Histochem Cytochem*, 46(5), 627-39.
- Dodt H.U., Leischner U., Schierloh A. et al. (2007). Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods*, 4(4), 331-336.
- Faverly D., Holland R., Burgers L. (1992). An original stereomicroscopic analysis of the mammary glandular tree. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 421(2), 115-119.
- 菱沼典子, 齋木茂樹, 大久保暢子 (2002). 看護学の枠組みを用いた形態機能学の教育方法と評価. 聖路加看護大学紀要, 28, 82-89.
- 梶原江美, 清村紀子, 鹿嶋聡子 (2008). 看護形態機能学の知識習得に関連したバリアとニードの構造. 西南女学院大学紀要, 12, 37-46.
- 京都大学 (2014). 医学部附属病院 呼吸器外科において世界初の生体肺移植術式を実施しました. http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/about/events_news/department/hospital/news/2014/140514_1.html, 2014 年 9 月 28 日.
- 水野操 (2013). 自宅ではじめるモノづくり超入門 3D プリンタと Autodesk 123D Design による新しい自宅製造業の始め方. pp.26-44. 東京: SB クリエイティブ.
- Saijo H. Kanno Y., Mori Y. et al. (2011). A novel method for designing and fabricating custom-made artificial bones. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 40(9), 955-960.
- サクラファインテックジャパン (2014). 電界攪拌染色装置 ヒスト・テック R-IHC. <http://www.sakura-finetek.com/newproduct/R-IHC.html>, 2014 年 9 月 28 日.
- 須藤益司 (2014). むっちゃんのステレオワールド ステレオフォトメーカー. <http://stereo.jp/jpn/index.html>, <http://stereo.jp/jpn/stphmkr/index.html>, 2014 年 9 月 28 日.
- Yokomizo T., Yamada-Inagawa T., Yzaguirre A.D. et al. (2012). Whole-mount three-dimensional imaging of internally localized immunostained cells within mouse embryos. *Nat Protoc*, 7(3), 421-431.

Stereo image of organ tissue constructed by confocal microscopy

– Application of 3D printer for education of histology –

KUROKAWA Kei

Japanese Red Cross Toyota College of Nursing

Abstract

Histology is an academic field mainly targeting cells and organ tissue. It is vital for understanding pathophysiology, since cells and tissue compose a hierarchy of the microscopic level between macroscopic structures and molecular functions in the human body. Routine microscopic observation is based on a plane view using transmitted light or electron beams of the microscope. Construction of stereo architecture from plane views in one's head is not easy. This is the reason why histology is hard to approach especially for beginners.

In this study, the methodology to construct three-dimensional (3D) images for education of histology is discussed. Autofluorescence of organ tissue is available enough to take images using confocal microscopy under the optimized exciting wavelength and detecting condition, which are diverse among various organs. A stereo image model of organ tissue constructed from confocal microscopic plane images was successfully formed using a 3D printer after patch-up procedures of the structure.

Visual models of organ tissue produced by utmost application of recent research progress and new technologies are effective not only for education of medical and healthcare professionals, but also for science education at school and health educational activities for the public.

